



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C08H 1/06, A61L 27/00	(11) Numéro de publication internationale: WO 90/12055 (43) Date de publication internationale: 18 octobre 1990 (18.10.90)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR90/00253 (22) Date de dépôt international: 10 avril 1990 (10.04.90) (30) Données relatives à la priorité: 89/04846 12 avril 1989 (12.04.89) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIOETICA [FR/FR]; 32, rue S.-Jean-de-Dieu, F-69007 Lyon (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : PETITE, Hervé [FR/FR]; 118, avenue S.-Exupéry, F-69500 Bron (FR). ME-NASCHE, Philippe [FR/FR]; 1, rue du Regard, F-75006 Paris (FR). HUC, Alain [FR/FR]; 26, chemin des Santons, F-69110 Ste-Foy-lès-Lyon (FR).	(74) Mandataires: PORTAL, Gérard etc. ; Cabinet Beau de Loménie, 55, rue d'Amsterdam, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BB, BE (brevet européen), BF (brevet OAPI), BG, BJ (brevet OAPI), BR, CA, CF (brevet OAPI), CG (brevet OAPI), CH + (brevet européen), CM (brevet OAPI), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FI, FR (brevet européen), GA (brevet OAPI), GB (brevet européen), HU, IT (brevet européen), JP, KP, KR, LK, LU (brevet européen), MC, MG, ML (brevet OAPI), MR (brevet OAPI), MW, NL (brevet européen), NO, RO, SD, SE (brevet européen), SN (brevet OAPI), SU, TD (brevet OAPI), TG (brevet OAPI), US. Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>

(54) Title: PROCESS FOR CROSS-LINKING OF COLLAGEN BY DIPHENYLPHOSPHORYLAZIDE, THE CROSS-LINKED COLLAGEN OBTAINED THEREBY, AND BIOMATERIALS OF COLLAGEN BASE THUS CROSS-LINKED

(54) Titre: PROCEDE DE RETICULATION DU COLLAGENE PAR LE DIPHENYLPHOSPHORYLAZIDE, COLLAGENE RETICULE AINSI OBTENU ET BIOMATERIAUX A BASE DE COLLAGENE AINSI RETICULES

(57) Abstract

The invention concerns a process for cross-linking of collagen of the type which comprises the formation of amide links through the intermediary of acylazide groups and is characterized by the fact that the collagen is made to react with the diphenylphosphorylazide. Said process simplifies the procedure for cross-linking of the collagen and makes it possible to adjust at will the degree of cross-linking without introducing a cross-linking agent.

(57) Abrégé

L'invention concerne un procédé de réticulation du collagène. Ce procédé est du type comprenant la formation de liaisons amides par l'intermédiaire de groupements acylazides et est caractérisé en ce qu'on fait réagir le collagène avec le diphénylphosphorylazide. Le procédé de l'invention permet de simplifier la procédure de réticulation du collagène et de régler le degré de réticulation à volonté sans introduire d'agent réticulant.

DESIGNATIONS DE "DE"

Jusqu'à nouvel avis, toute désignation de "DE" dans toute demande internationale dont la date de dépôt international est antérieure au 3 octobre 1990 a effet dans le territoire de la République fédérale d'Allemagne à l'exception du territoire de l'ancienne République démocratique allemande.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NO	Norvège
BJ	Bénin	IT	Italie	RO	Roumanie
BR	Brésil	JP	Japon	SD	Soudan
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CG	Congo	LI	Lesotho	SU	Union soviétique
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

Procédé de réticulation du collagène par le diphénylphosphoryl-
azide, collagène réticulé ainsi obtenu et biomatériaux à base de
collagène ainsi réticulés.

05 La présente invention concerne essentiellement un procédé
de réticulation du collagène par le diphénylphosphorylazide, le
collagène réticulé ainsi obtenu ainsi que les biomatériaux à base
de collagène ainsi réticulés.

10 On sait que le collagène constitue le tiers des protéines
de l'être vivant. Sa faible immunogénicité, son effet sur la crois-
sance cellulaire et ses propriétés mécaniques importantes lui
confèrent un intérêt évident en tant que matière première pour les
biomatériaux. Cependant, lorsqu'il est implanté, il subit une
15 dégradation plus ou moins rapide selon la forme sous laquelle il se
trouve (solutions, éponges, films ou tissus natifs), selon le lieu
d'implantation et l'espèce animale. Cette dégradation du collagène
est parfois souhaitable (pansements cicatrisants), parfois gênante
(bioprothèses valvulaires, vasculaires, etc.).

Par ailleurs, la dégradation du collagène est un proces-
sus normal faisant partie de la croissance, du développement et du
20 renouvellement des tissus conjonctifs. Elle fait aussi partie inté-
grante du processus de cicatrisation. Cette dégradation du colla-
gène fait intervenir un certain nombre d'enzymes, en particulier
les collagénases qui sont responsables de l'attaque initiale du
collagène natif à pH neutre. Elles cliveraient les trois chaînes
25 peptidiques simultanément. Le clivage a lieu entre les résidus
GLY-LEU ou GLY-ILE. Cependant, il est actuellement admis que cette
dégradation nécessite les effets coopératifs d'un certain nombre
d'enzymes parmi lesquelles la stromélysine, les gélatinases.

Lors de l'utilisation du collagène en tant que bio-
30 matériau, il est par conséquent très intéressant de pouvoir
moduler la biodégradabilité du collagène en fonction de
l'utilisation envisagée. Cette biodégradabilité peut être modulée
par au moins deux manières qui consistent soit en l'addition
d'inhibiteurs enzymatiques (tels que l' α -2-macroglobuline ou la
35 β -1-anticollagénase), soit encore par l'introduction de liaisons
chimiques de réticulation entre les molécules de collagène. Cette

seconde méthode est la plus largement utilisée, car elle est plus efficace sur le plan de la résistance à la dégradation enzymatique. Les liaisons de réticulation peuvent être obtenues soit par des méthodes physiques qui ont l'avantage de ne pas introduire d'agent chimique dans le tissu, mais qui s'avèrent peu efficaces, soit encore par des méthodes chimiques qui sont efficaces mais laissent dans le tissu des traces d'agent réticulant. Ainsi, le glutaraldéhyde (en abrégé GTA) est l'agent réticulant le plus largement employé, mais il a malheureusement la propriété de se polymériser en solution. C'est ainsi que, lors de la réticulation du collagène, il y a formation de polymères de GTA qui relargueront au cours du temps des monomères de GTA (qui sont cytotoxiques à des concentrations supérieures à 10-25 ppm) dans les tissus environnants en faisant perdre au collagène une partie de ses propriétés biologiques pour lesquelles il avait été choisi.

Pour éviter l'utilisation de glutaraldéhyde, les présents inventeurs avaient déjà proposé, dans le document FR-A-8710317, un procédé de réticulation du collagène par introduction de groupements azides sur les groupements carboxyliques des chaînes latérales du collagène. Dans ce document, la réticulation était effectuée par une estérification des groupements carboxyliques du collagène, puis les esters étaient successivement transformés en hydrazides, puis en acylazides. Les acylazides réagissaient finalement en milieu basique avec les fonctions aminées des chaînes latérales du collagène pour donner des liaisons de type peptidique. Ce procédé, bien que très innovant, présente l'inconvénient d'être long puisque la réticulation du collagène nécessite 8 jours et est peu commode à utiliser à l'échelle industrielle, ce délai étant difficilement compatible avec une exploitation industrielle.

Les présents inventeurs ont poursuivi leurs recherches afin de simplifier la méthode de réticulation tout en n'introduisant pas d'agent réticulant dans le matériau fini et en obtenant un degré de réticulation du collagène équivalent à celui obtenu par le procédé décrit dans le document FR-A-8710317.

Ainsi, la présente invention a pour but de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'un procédé

de réticulation du collagène simplifié tout en n'introduisant pas d'agent réticulant dans le matériau fini et en obtenant un degré de réticulation du collagène équivalent à celui obtenu par les procédés antérieurement décrits, et notamment celui décrit dans le document FR-A-8710317.

La présente invention a encore pour but de résoudre le nouveau problème technique énoncé ci-dessus avec une durée de réticulation radicalement réduite.

La présente invention résout pour la première fois les problèmes techniques énoncés ci-dessus d'une manière extrêmement simple, reproductible, dont les paramètres du procédé peuvent être variés à volonté, de manière à régler à volonté le degré de réticulation du collagène en fonction des utilisations souhaitées, et à un faible coût.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention fournit un procédé de réticulation du collagène du type comprenant la formation de liaisons amides par l'intermédiaire de groupements acylazides, caractérisé en ce qu'on fait réagir le collagène avec le diphénylphosphorylazide (DPPA).

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé selon l'invention, la réaction avec le DPPA a lieu dans un milieu solvant non aqueux. De préférence, ce solvant non aqueux est constitué par du diméthylformamide (DMF).

Selon une variante de réalisation avantageuse, la concentration en DMF est comprise entre 0,0125% et 1,50% en volume/volume et encore de préférence entre 0,25 et 0,7%.

Selon une variante de réalisation avantageuse du procédé selon l'invention, la réaction avec le DPPA est réalisée par incubation à une température d'incubation comprise entre environ 0 et 10°C, de préférence environ 4°C, pendant une durée d'incubation de quelques heures à environ 1 jour, de préférence environ 1 jour.

Selon une caractéristique particulièrement avantageuse du procédé selon l'invention, après réaction du collagène avec le DPPA, on réalise au moins un rinçage pour éliminer le DPPA, puis on introduit le collagène comportant des groupements acylazides dans une solution de tampon borate.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé selon l'invention, on réalise une incubation du collagène comportant des groupements acylazides dans le tampon borate, avantageusement à une température comprise entre environ 0 et environ 10°C, encore de
05 préférence d'environ 40°C, pendant une durée d'incubation de quelques heures à environ 1 jour, de préférence environ 1 jour.

Selon un mode de réalisation avantageux, le tampon borate est à un pH environ égal à 8,9.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux du
10 procédé selon l'invention, le collagène utilisé comme matériau de départ et mis à réagir avec le DPPA est sous forme de gel, de film ou de tissu naturel par exemple péricarde ou greffon vasculaire.

Selon un deuxième aspect, la présente invention couvre également le collagène réticulé par l'intermédiaire du diphényl-
15 phosphorylazide.

L'invention couvre également le collagène réticulé, caractérisé en ce qu'il est obtenu par le procédé de réticulation précédemment décrit.

L'invention couvre enfin tous les biomatériaux à base de
20 collagène, caractérisés en ce qu'ils ont été réticulés par l'intermédiaire du DPPA.

Sans qu'on puisse connaître avec certitude le mécanisme réactionnel mis en jeu lors de la réticulation du collagène par le DPPA, on peut, en raisonnant par analogie avec le mécanisme réactionnel proposé pour la formation de liaison amide par le DPPA sur
25 les acides carboxyliques, proposer le mécanisme réactionnel représenté à la figure 1 annexée. On observe que l'anion carboxylique (a), qui est fourni par les groupements carboxyliques latéraux de de l'acide aspartique ou glutamique des chaînes peptidiques du
30 collagène, peut attaquer l'atome de phosphore du DPPA (b) pour donner essentiellement un composé phosphoré pentacovalent (c). Ensuite, il se produit une migration du groupement azide de l'atome de phosphore vers l'atome de carbone carboxylique par un réarrangement de type substitution nucléophile interne.

35 Finalement, l'acylazide formé (d) va réagir avec les groupements aminés latéraux de la lysine et de l'hydroxylysine des

chaînes peptidiques du collagène pour donner une liaison de type amide.

On constate ainsi que l'invention permet de simplifier d'une manière totalement inattendue le procédé de réticulation du collagène, ce procédé étant extrêmement simple, peu coûteux, et ne nécessitant qu'une durée relativement faible de réticulation, ce qui représente un avantage technique remarquable, déterminant pour un homme de l'art par rapport aux techniques antérieures.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à la lumière de la description explicative qui va suivre faite en référence à plusieurs exemples de réalisation donnés simplement à titre d'illustration et qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée de l'invention.

Dans les dessins,

- la figure 1 représente une hypothèse de mécanisme réactionnel de la réaction de réticulation du collagène par réaction du diphénylphosphorylazide sur les groupements carboxyliques du collagène;

- la figure 2 représente l'évolution du pourcentage de réticulation du collagène, appelé RTP, mesuré à partir de la température du pic de dénaturation (TP) du collagène, sur du péricarde de veau en fonction de la concentration en DPPA ; et

- la figure 3 représente l'évolution du pourcentage de réticulation RTP sur des films de collagène en fonction de la concentration en DPPA.

EXEMPLE 1

Réticulation par le DPPA du péricarde de veau.

a) Préparation du matériau de départ.

On prélève aux abattoirs des péricardes de veau moins d'une heure après leur mise à mort. Ces péricardes sont alors dégraissés et lavés dans une solution de NaCl 0,9%. Ils sont ensuite découpés à l'emporte-pièce en pastilles de 1 cm².

b) Réticulation du péricarde :

Cette réaction peut être résumée comme suit :

Quatre pastilles de péricarde, préalablement rincées dans

10 ml de DMF pur durant 5 min afin de débarrasser le tissu de son eau, sont incubées pour 24 h à 4°C dans 10 ml d'une solution de DMF contenant 0,75% de DPPA (concentration exprimée en volume/volume). Le tissu est ensuite débarrassé du DPPA par rinçage dans 10 ml de solution de DMF. Le DMF est ensuite éliminé par rinçage dans 10 ml d'une solution de tampon borate pH 8,9 (tétraborate de sodium 0,04 M, acide borique 0,04 M). Le tissu est finalement incubé pour une nuit dans un tampon borate pH 8,9. Le tissu est alors par exemple conservé dans une solution d'éthanol à 70°.

10

EXEMPLE 2

Réticulation par le DPPA d'un film de collagène

a) Préparation du matériau de départ.

Un gel est préparé à partir de peaux de veaux préalablement lavées et épilées par un mélange chaux-sulfure. Elles sont ensuite déchaulées dans un bain contenant du chlorure d'ammonium (2%) et du métabisulfite de sodium. Elles sont ensuite neutralisées, puis les sels sont éliminés par deux lavages à l'eau. Elles sont alors broyées, puis lavées par du tampon phosphate pH 7,8 (dihydrogénophosphate de potassium 0,78 g/l et monohydrogénophosphate disodique 21,7 g/l). Le phosphate est ensuite éliminé par deux lavages successifs à l'eau permutée. Le broyat est alors acidifié par une solution d'acide acétique à 10%, la quantité d'acide acétique étant de 5% par rapport au collagène. Le broyat est alors malaxé afin d'obtenir une pâte homogène. Cette pâte est alors diluée pour obtenir un gel ayant une concentration de 0,7% en collagène. Le gel est alors mis dans de petits moules en Téflon, puis laissé évaporer. Le film ainsi obtenu est ensuite découpé à l'emporte-pièce en pastille de 1 cm².

30

b) Réticulation du film :

Cette réaction peut être résumée comme suit :

Quatre pastilles de films de 1 cm² de surface sont incubées pour 24 h à 4° dans 10 ml d'une solution de DMF contenant 0,25% de DPPA (concentration exprimée en volume/volume). Le film est ensuite débarrassé du DPPA par rinçage dans 10 ml de solution de DMF. Le DMF est ensuite éliminé par rinçage dans 10 ml d'une

35

solution tampon borate pH 8,9 (tétraborate de sodium 0,04 M, acide borique 0,04 M). Les films sont finalement incubés pendant une nuit dans un tampon borate pH 8,9. Ils sont alors essorés sur un papier-filtre, puis séchés à l'air libre. Ils peuvent être ensuite stérilisés par exemple aux rayons gamma.

De la même façon, on peut réticuler des éponges, des tubes, des fils de collagène, etc.

EXEMPLE 3

10 A. Influence de la concentration en DPPA sur la réticulation du péricarde de veau.

Une première partie du travail a consisté à étudier l'influence de la concentration en DPPA sur le degré de réticulation du péricarde. Pour cela, le péricarde est incubé dans des solutions de DPPA de concentrations variant entre 0,0125 % et 1,5 % (volume/volume).

La mesure du degré de réticulation du collagène est réalisée par analyse calorimétrique à balayage. Cette technique consiste à mesurer, lors d'une montée linéaire de la température, la différence d'énergie qu'il faut fournir à l'échantillon et à une référence pour les maintenir à une température identique. Lorsque le collagène se dénature, un pic d'absorption de chaleur apparaît sur l'enregistreur. On définit ainsi la température de début de dénaturation (TD), la température du pic de dénaturation (TP) et la température de fin de dénaturation (TF).

Afin de calculer un pourcentage de réticulation R du collagène, on effectue le calcul suivant :

$$R = \frac{(TX-TI)}{(TM-TI)} \times 100$$

30 TM : température de dénaturation maximum qu'il est possible d'obtenir lorsqu'on réticule le collagène par le DPPA; en l'occurrence, pour le cas présent, elle correspond à la température obtenue avec une concentration en DPPA ([DPPA]) de 0,75%.

35 TI : température de dénaturation obtenue sur le tissu non traité.

TX : température de dénaturation obtenue sur le tissu avec une concentration en DPPA X.

05 R est le % de réticulation calculé à partir de TP, la température du pic de dénaturation, et est appelé RTP. L'évolution de RTP en fonction du $\text{Log}([\text{DPPA}] \times 1000)$ est représentée sur la figure 2. Les inventeurs déterminent ainsi qu'entre 0,0125% et 0,50% l'évolution de RTP en fonction du $\text{Log}([\text{DPPA}] \times 1000)$ est linéaire et qu'à partir de 0,5-0,75% on obtient une réticulation maximum et constante quelle que soit la concentration en DPPA.

10 Si l'on compare la température de dénaturation obtenue avec le DPPA 0,75% ou 0,5% à celle obtenue avec le procédé proposé dans le brevet n° 8710317 et à celle du GTA 0,6% (traitement classique des bioprothèses valvulaires), on constate que ces valeurs ne sont pas significativement différentes (tableau I).

15 B. Influence de la concentration en DPPA sur la réticulation de film de collagène.

Nous avons étudié l'influence de la concentration en DPPA sur le degré de réticulation du film de collagène. Pour cela, le film est incubé dans des solutions de DPPA de concentrations variant entre 0,0125% et 1,0% (volume/volume).

20 Tout comme avec le péricarde de veau, on calcule l'évolution de RTP en fonction du $\text{Log}([\text{DPPA}] \times 1000)$ (figure 3). Les inventeurs déterminent ainsi qu'entre 0,0125% et 0,10% l'évolution de RTP en fonction du $\text{Log}([\text{DPPA}] \times 1000)$ est linéaire. Un maximum de réticulation étant obtenu avec des concentrations en DPPA de 0,25%-0,5%.

25 Si l'on compare la température de dénaturation obtenue avec le DPPA 0,15% ou 0,5% à celle obtenue avec le procédé proposé dans le brevet n° 8710317 et à celle du GTA 0,6% (traitement classique des bioprothèses valvulaires), on constate que ces valeurs ne sont pas significativement différentes (tableau I).

30 C. Dosage du DPPA après réticulation du péricarde.

Afin de déterminer le devenir du DPPA après réticulation, un dosage du DPPA par l'intermédiaire de son groupement phosphate est réalisé.

Dans un premier temps, on dose le phosphore sur le matériau traité par le DPPA à différentes concentrations sans effectuer de rinçage. Le matériau traité est simplement séché au four à 110°C. Le dosage du phosphore est réalisé par spectrométrie d'émission plasma après minéralisation par une solution d'acides perchlorique et nitrique (2/3 / 1/3 en volume/volume). Les résultats sont exprimés en pourcentage de phosphore par rapport au poids de tissu sec. Les résultats sont consignés dans le tableau II.

Dans un second temps, on dose le phosphore sur le matériau traité par le DPPA à des concentrations de 0,5% et 1,0% après avoir rincé le tissu soit dans du tampon borate seul, soit dans du DMF, puis du tampon borate. Les résultats sont consignés dans le tableau III.

T A B L E A U I

Comparaison des températures de dénaturation de péricarde de veau ou de film de collagène traités par le GTA, les acylazides selon le procédé du brevet n° 8710317, le DPPA ou non traité.

		Température de dénaturation, °C		
		TD	TP	TF
25	Péricarde frais	64,30	67,30	81,30
	Péricarde GTA 0,6%	82	85,30	93,80
	Péricarde azide	78	81,40	89,10
	Péricarde DPPA 0,5%	78,50	81,40	91,70
	Péricarde DPPA 0,75%	79,20	82	89,90
30	Film non traité	39,15	49,12	66,10
	Film GTA 0,6%	71,10	79,10	86,40
	Film azide	65,50	74,40	83
	Film DPPA 0,25%	69,90	72,70	80,50
	Film DPPA 0,50%	70,30	72,60	79,20

TABLEAU II

Pourcentage de phosphore résiduel dosé directement après traitement du péricarde par le DPPA à des concentrations allant de 0% à 1,5%.

05 Aucun rinçage n'étant effectué après traitement par le DPPA.

	[DPPA] %	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00	1,50
10	Phosphore %	0,1±0,0	1,0±0,1	1,4±0,2	1,7±0,2	1,7±0,2	2,2±0,1

TABLEAU III

15 Dosage du phosphore résiduel après traitement du péricarde par le DPPA à des concentrations de 1,0% et 0,5%. La quantité de phosphore déterminée après 3 rinçages du tissu dans le borate pour une concentrations de 0,5% n'est pas différente de celle déterminée pour un tissu incubé dans le DMF sans agent réticulant

20 (cf. tableau II).

	Concen- tration	0 rinçage DMF 3 rinçages en DPPA borate	3 rinçages DMF 3 rinçages borate	5 rinçages DMF 3 rinçages borate	8 rinçages DMF 3 rinçages borate
25	1,0%	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,06	0,17 ± 0,03	0,18 ± 0,01
	0,5%	0,09 ± 0,06	0,04 ± 0,05	0,09 ± 0,03	0,1 ± 0,06

30

- Il apparaît qu'avec une concentration en DPPA de 0,5% le phosphore résiduel, même après simplement trois rinçages avec du tampon borate, est équivalent à celui trouvé pour un péricarde incubé dans le DMF sans agent réticulant (respectivement 0,09% et

35 0,1%).

Ainsi, il apparaît que l'agent réticulant ne subsiste pas dans le tissu après réticulation. Ainsi, ce nouveau procédé apparaît tout à fait innovant. Il permet, tout comme le procédé proposé dans le document FR-A-8710317, une réticulation du collagène sans introduire d'agent réticulant de façon définitive et, de plus, il est d'une utilisation nettement facilitée sur le plan industriel.

Naturellement, l'invention comprend tous les moyens constituant des équivalents techniques des moyens décrits ainsi que leurs diverses combinaisons.

R E V E N D I C A T I O N S

05 1 - Procédé de réticulation du collagène du type comprenant la formation de liaisons amides par l'intermédiaire de groupements acylazides, caractérisé en ce qu'on fait réagir le collagène avec le diphénylphosphorylazide (DPPA).

2 - Procédé selon la revendications 1, caractérisé en ce que la réaction avec le DPPA a lieu dans un milieu solvant non aqueux.

10 3 - Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le solvant non aqueux est le diméthylformamide.

4 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la concentration en DPPA est comprise entre 0,0125% et 1,5% en volume/volume, de préférence entre 0,25 et 15 0,70%.

5 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la réaction est réalisée par incubation à une température comprise entre environ 0 et environ 10°C, de préférence à environ 4°C, la durée d'incubation étant de préférence comprise 20 entre quelques heures et environ 1 jour, de préférence d'environ 1 jour.

6 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'après réaction avec le DPPA on réalise au moins un rinçage pour éliminer le DPPA, puis on introduit le collagène comportant des groupements acylazides dans une solution de tampon 25 borate.

7 - Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on réalise une incubation à une température comprise entre environ 0 et environ 10°C, de préférence environ 4°C, dans le tampon 30 borate.

8 - Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le tampon borate est à un pH égal à environ 8,9.

9 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le collagène utilisé comme matériau de départ est 35 sous forme de gel, de film ou de tissu naturel, par exemple péricarde ou greffon vasculaire.

10 - Collagène réticulé, caractérisé en ce qu'il est réticulé par l'intermédiaire du diphénylphosphorylazide.

11 - Collagène réticulé, caractérisé en ce qu'il est obtenu par le procédé tel que décrit à l'une quelconque des revendications 1 à 9.

12 - Biomatériau à base de collagène, caractérisé en ce qu'il a été réticulé par l'intermédiaire du diphénylphosphorylazide.

10

15

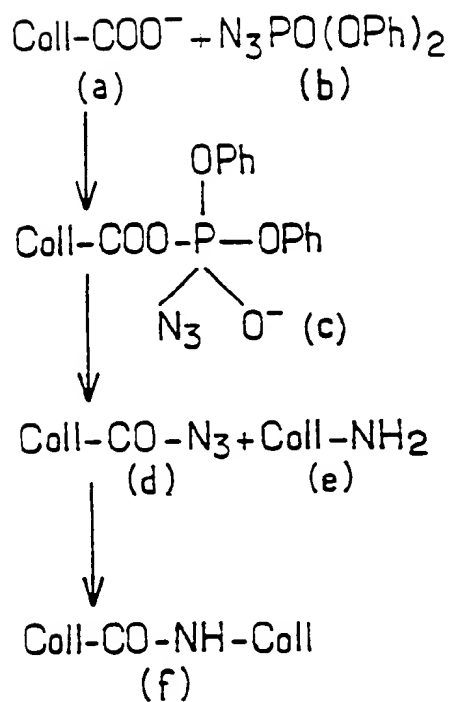
20

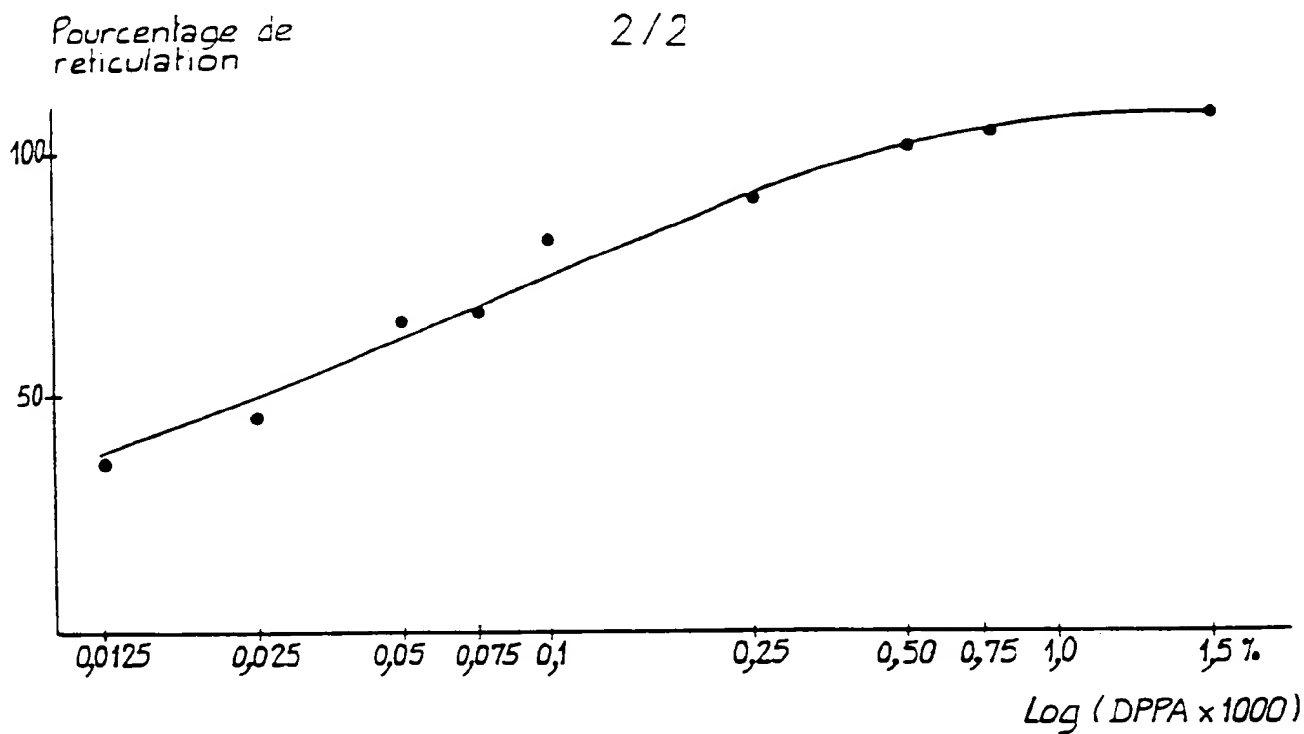
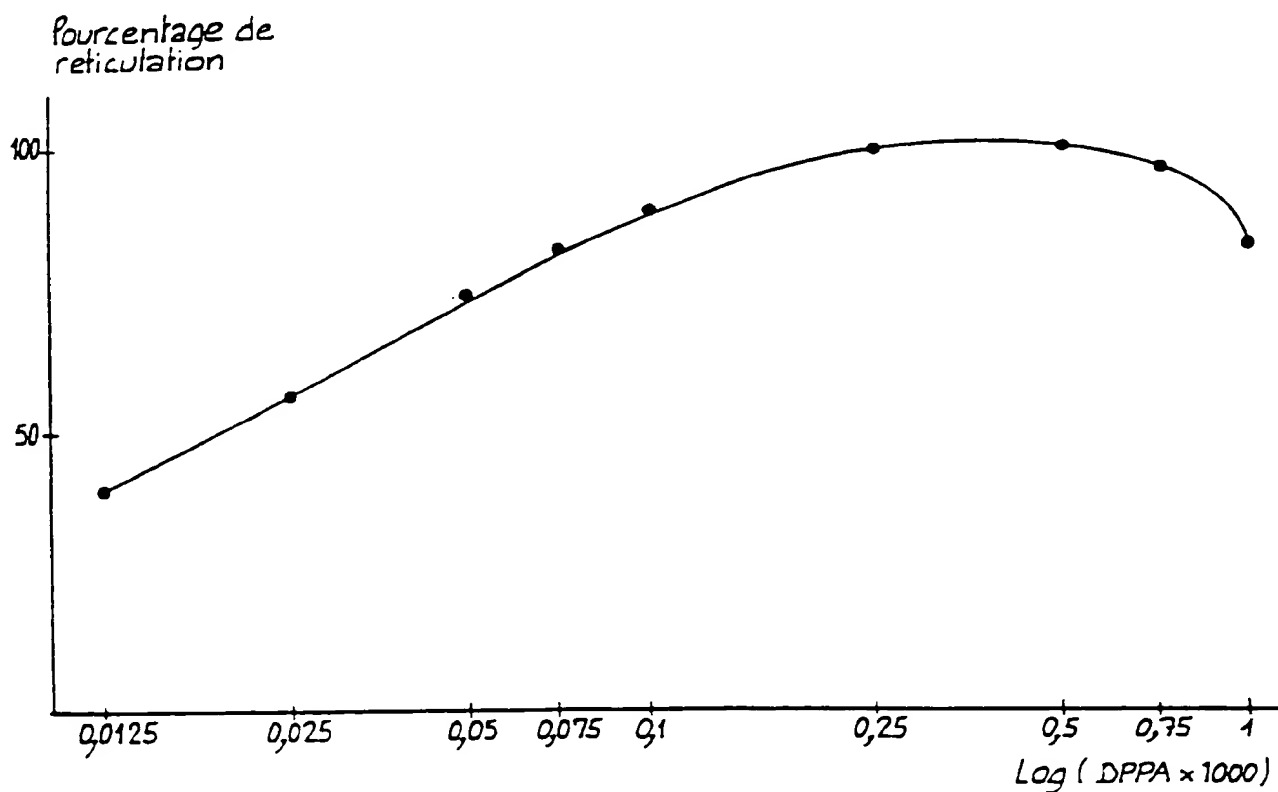
25

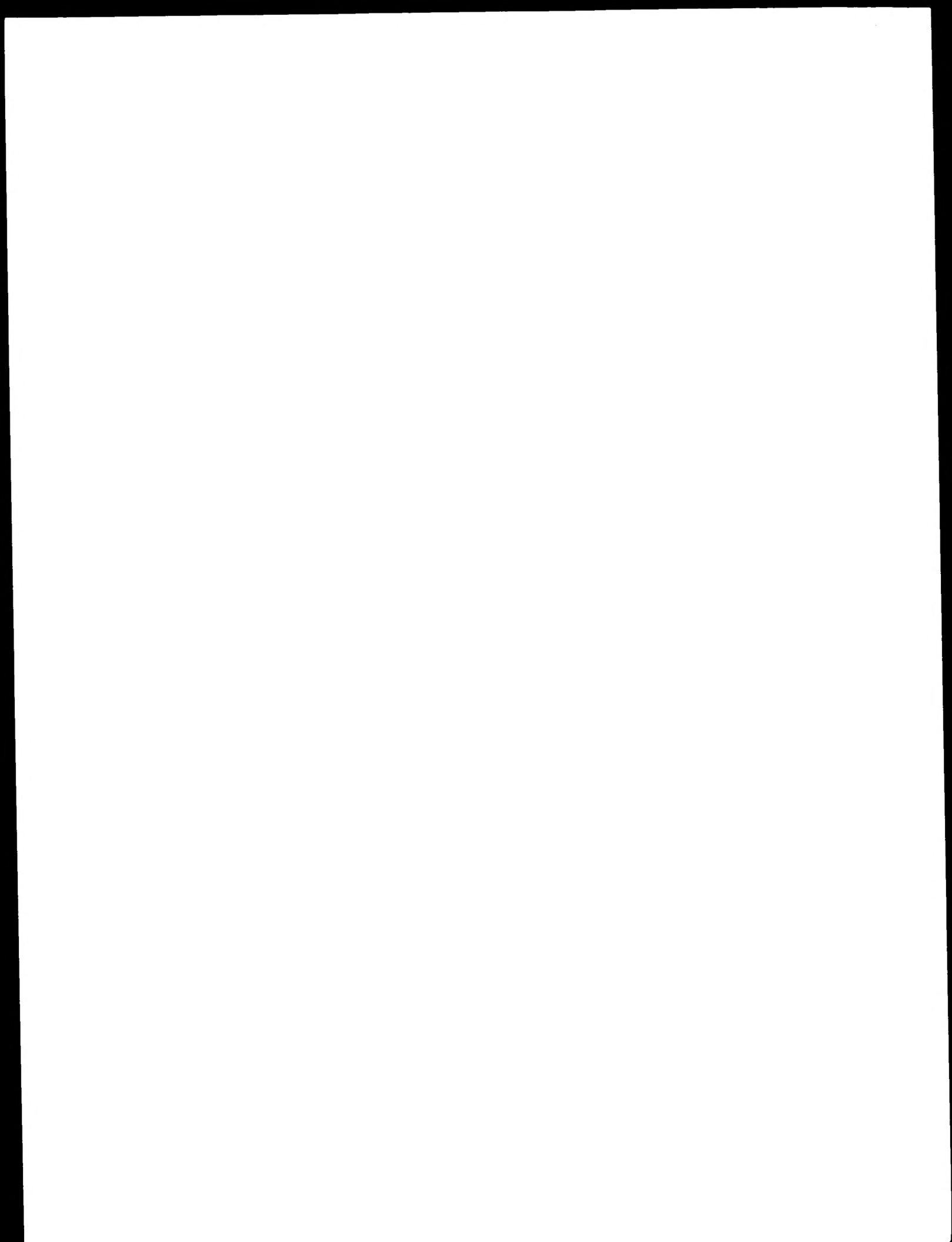
30

35

1/2

Figure 1**FEUILLE DE REMPLACEMENT**

Figure 2Figure 3



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C08H 1/06, A61L 27/00		A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 90/12055 (43) Date de publication internationale: 18 octobre 1990 (18.10.90)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR90/00253 (22) Date de dépôt international: 10 avril 1990 (10.04.90)		(74) Mandataires: PORTAL, Gerard etc. : Cabinet Beau de Lomenie, 55, rue d'Amsterdam, F-75008 Paris (FR).	
(30) Données relatives à la priorité: 89/04846 12 avril 1989 (12.04.89) FR		(81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BB, BE (brevet européen), BF (brevet OAPI), BG, BJ (brevet OAPI), BR, CA, CF (brevet OAPI), CG (brevet OAPI), CH + (brevet européen), CM (brevet OAPI), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FI, FR (brevet européen), GA (brevet OAPI), GB (brevet européen), HU, IT (brevet européen), JP, KP, KR, LK, LU (brevet européen), MC, MG, ML (brevet OAPI), MR (brevet OAPI), MW, NL (brevet européen), NO, RO, SD, SE (brevet européen), SN (brevet OAPI), SU, TD (brevet OAPI), TG (brevet OAPI), US.	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIOETICA [FR/FR]; 32, rue S.-Jean-de-Dieu, F-69007 Lyon (FR). (72) Inventeurs: et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PETITE, Hervé [FR/FR]; 118, avenue S.-Exupéry, F-69500 Bron (FR). MENASCHE, Philippe [FR/FR]; 1, rue du Regard, F-75006 Paris (FR). HUC, Alain [FR/FR]; 26, chemin des Santons, F-69110 Ste-Foy-lès-Lyon (FR).		Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues. (88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 15 novembre 1990 (15.11.90)	

(54) Title: PROCESS FOR CROSS-LINKING OF COLLAGEN BY DIPHENYLPHOSPHORYLAZIDE, THE CROSS-LINKED COLLAGEN OBTAINED THEREBY, AND BIOMATERIALS OF COLLAGEN BASE THUS CROSS-LINKED

(54) Titre: PROCÉDE DE RETICULATION DU COLLAGÈNE PAR LE DIPHENYLPHOSPHORYLAZIDE, COLLAGÈNE RETICULÉ AINSI OBTENU ET BIOMATÉRIAUX À BASE DE COLLAGÈNE AINSI RETICULÉS

(57) Abstract

The invention concerns a process for cross-linking of collagen of the type which comprises the formation of amide links through the intermediary of acylazide groups and is characterized by the fact that the collagen is made to react with the diphenylphosphorylazide. Said process simplifies the procedure for cross-linking of the collagen and makes it possible to adjust at will the degree of cross-linking without introducing a cross-linking agent.

(57) Abrégé

L'invention concerne un procédé de réticulation du collagène. Ce procédé est du type comprenant la formation de liaisons amides par l'intermédiaire de groupements acylazides et est caractérisé en ce qu'on fait réagir le collagène avec le diphenylphosphorylazide. Le procédé de l'invention permet de simplifier la procédure de réticulation du collagène et de régler le degré de réticulation à volonté sans introduire d'agent réticulant.

DESIGNATIONS OF "DE"

Until further notice, any designation of "DE" in any international application whose international filing date is prior to October 3, 1990, shall have effect in the territory of the Federal Republic of Germany with the exception of the territory of the former German Democratic Republic.

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	ES	Spain	MC	Monaco
AU	Australia	FI	Finland	MG	Madagascar
BB	Barbados	FR	France	ML	Mali
BE	Belgium	GA	Gabon	MR	Mauritania
BF	Burkina Faso	GB	United Kingdom	MW	Malawi
BG	Bulgaria	GR	Greece	NL	Netherlands
BJ	Benin	HU	Hungary	NO	Norway
BR	Brazil	IT	Italy	RO	Romania
CA	Canada	JP	Japan	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KP	Democratic People's Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KR	Republic of Korea	SN	Senegal
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Chad
DE	Germany, Federal Republic of	LU	Luxembourg	TG	Togo
DK	Denmark			US	United States of America

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 90/00253

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. ⁵ C 08 H 1/06, A 61 L 27/00		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. ⁵ C 08 H, C 08 K, A 61 L		
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT⁸		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	EP, A, 0070021 (MERCK & CO. INC.) 19 January 1983 see page 6, line 40 - page 8, line 5; examples 11,13; claims	1-7
X	Int. J. Peptide Protein Res., vol. 22, 1983, J.D. Young et al.: "Synthesis of a cyclic fibrin-like peptide and its analysis by fast atom bombardment mass spectrometry", pages 374-380, see page 380, left hand column, paragraph 3	1-7
A	US, A, 4755593 (M.D. LAUREN) 5 July 1988	
A	EP, A, 0301977 (INSERM) 4 February 1989 (cited in the application)	
A	FR, A, 2172162 (DAIICHI PURE CHEMICALS) 28 September 1973 see page 5	

<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
11 September 1990 (11.09.90)		11 October 1990 (11.10.90)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
EUROPEAN PATENT OFFICE		

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9000253
SA 36708

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 26/09/90
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0070021	19-01-83	US-A- 4374060 JP-A- 58018345	15-02-83 02-02-83
US-A- 4755593	05-07-88	None	
EP-A- 0301977	01-02-89	FR-A- 2617855	13-01-89
FR-A- 2172162	28-09-73	JP-A- 48081838 DE-A, B 2307263 GB-A- 1415056 US-A- 3873509	01-11-73 13-09-73 26-11-75 25-03-75

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 90/00253

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB ⁵ : C 08 H 1/06, A 61 L 27/00		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁵	C 08 H, C 08 K, A 61 L	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure ou de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
X	EP, A, 0070021 (MERCK & CO. INC.) 19 janvier 1983 voir page 6, ligne 40 - page 8, ligne 5; exemples 11,13; revendications --	1-7
X	Int. J. Petptide Protein Res., vol. 22, 1983, J.D. Young et al.: "Synthesis of a cyclic fibrin-like peptide and its analysis by fast atom bombard- ment mass spectrometry", pages 374-380, voir page 380, colonne de gauche, alinéa 3 --	1-7
A	US, A, 4755593 (M.D. LAUREN) 5 juillet 1988 ./. --	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
11 septembre 1990		
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	 Natalia Weinberg	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
A	EP, A, 0301977 (INSERM) 1 février 1989 (cité dans la demande)	

A	FR, A, 2172162 (DAIICHI PURE CHEMICALS) 28 septembre 1973 voir page 5	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9000253
SA 36708

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 26/09/90
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0070021	19-01-83	US-A- 4374060 JP-A- 58018345	15-02-83 02-02-83
US-A- 4755593	05-07-88	Aucun	
EP-A- 0301977	01-02-89	FR-A- 2617855	13-01-89
FR-A- 2172162	28-09-73	JP-A- 48081838 DE-A, B 2307263 GB-A- 1415056 US-A- 3873509	01-11-73 13-09-73 26-11-75 25-03-75

ETO FORM P0072

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

